

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 13815:2023

Xuất bản lần 1

**NƯỚC QUẢ – XÁC ĐỊNH
TỶ SỐ ĐỒNG VỊ CACBON BỀN ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) CỦA ETANOL –
PHƯƠNG PHÁP ĐO KHỐI PHỔ TỶ SỐ ĐỒNG VỊ**

*Fruit juices – Determination of stable carbon isotope ratio ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) of ethanol –
Isotope ratio mass spectrometric method*

HÀ NỘI – 2023

Lời nói đầu

TCVN 13815:2023 do Ban kỹ thuật tiêu chuẩn quốc gia TCVN/TC/F10 *Rau quả và sản phẩm rau quả* biên soạn, Viện Tiêu chuẩn Chất lượng Việt Nam đề nghị, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng thẩm định, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

Nước quả – Xác định tỷ số đồng vị cacbon bền ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) của etanol – Phương pháp đo khối phổ tỷ số đồng vị

Fruit juices – Determination of stable carbon isotope ratio ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) of ethanol – Isotope ratio mass spectrometric method

CẢNH BÁO – Khi áp dụng tiêu chuẩn này có thể liên quan đến các vật liệu, thiết bị và các thao tác gây nguy hiểm. Tiêu chuẩn này không đưa ra được hết tất cả các vấn đề an toàn liên quan đến việc sử dụng chúng. Người sử dụng tiêu chuẩn này phải tự thiết lập các thao tác an toàn thích hợp và xác định khả năng áp dụng hoặc các giới hạn quy định trước khi sử dụng tiêu chuẩn.

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp xác định tỷ số đồng vị cacbon bền ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) của etanol từ quá trình lên men rượu trong nước quả, bằng máy đo khối phổ tỷ số đồng vị (IRMS).

Kết quả xác nhận giá trị sử dụng của phương pháp được nêu trong Phụ lục A.

2 Tài liệu viện dẫn

Các tài liệu viện dẫn sau là rất cần thiết cho việc áp dụng tiêu chuẩn. Đối với các tài liệu viện dẫn ghi năm công bố thì áp dụng phiên bản được nêu. Đối với các tài liệu viện dẫn không ghi năm công bố thì áp dụng phiên bản mới nhất, bao gồm cả các sửa đổi, bổ sung (nếu có).

TCVN 4851 (ISO 3696), *Nước dùng để phân tích trong phòng thí nghiệm – Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử.*

3 Nguyên tắc

Đường được chuyển hóa thành etanol qua quá trình lên men, sau đó etanol được tinh sạch bằng cách chưng cất. Tiến hành xác định tỷ số đồng vị cacbon 13 so với cacbon 12 bền ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) của etanol trên cacbon dioxit (CO_2) tạo thành từ quá trình đốt cháy etanol thu được. Tỷ số chênh lệch các số khối 44, 45

TCVN 13815:2023

và 46 của cacbon dioxit được xác định bằng máy đo khối phổ tỷ số đồng vị. Sau đó, thành phần đồng vị cacbon 13 ($\delta^{13}\text{C}$) được tính theo thang đo delta bằng cách so sánh các kết quả thu được trên chuẩn làm việc (ví dụ: axit glutamic), đã hiệu chuẩn trước bằng chuẩn cacbonat đạt chuẩn quốc tế V.PDB¹⁾.

CHÚ THÍCH: Etanol được tạo thành từ quá trình lên men, tạo mẫu thử thích hợp để xác định đặc tính của đường tiền chất và có thể sử dụng để phát hiện các loại đường khác nhau được bổ sung vào nước quả và xirô cây phong. Việc bổ sung đường C₄ và C₃ từ thực vật (trong tất cả các loại quả thông thường trừ nước dứa) và xirô cây phong sẽ làm tăng giá trị $\delta^{13}\text{C}$ của etanol. Do đó, việc bổ sung đường C₃ từ thực vật vào nước dứa sẽ làm giảm giá trị $\delta^{13}\text{C}$ của etanol.

4 Thuốc thử và vật liệu thử

Chỉ sử dụng thuốc thử và vật liệu thử đạt chất lượng phân tích và nước tối thiểu đạt loại 3 của TCVN 4851 (ISO 3696).

4.1 Nấm men (*Saccharomyces bayanus cerevisiae*), khô.

4.2 Thuốc thử Karl Fischer

CẢNH BÁO – Thuốc thử Karl Fischer rất độc, dễ cháy nổ và dễ hấp thụ qua da do vậy cần xử lý cẩn thận. Cần thu nhận dịch chiết Karl Fischer như là chất thải độc hại.

4.3 Chất chuẩn làm việc đã biết tỷ số $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, hiệu chuẩn theo chuẩn gốc (ví dụ: axit glutamic, độ tinh khiết > 99 %).

4.4 Chuẩn quốc tế đã biết tỷ số $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, ví dụ: NBS 22²⁾.

4.5 Đá bọt.

4.6 Capsul thiếc (cốc thiếc), phù hợp cho chất lỏng (kích thước 2 mm x 5 mm, dung tích 12 μL) và chất rắn (kích thước từ 4 mm x 6 mm, dung tích 70 μL).

5 Thiết bị, dụng cụ

Sử dụng các thiết bị, dụng cụ của phòng thử nghiệm thông thường và các thiết bị, dụng cụ cụ thể sau:

5.1 Máy đo khúc xạ, để đo hàm lượng chất rắn hòa tan (độ Brix).

5.2 Bình lên men, dung tích 1,5 L, có gắn bộ phận bẫy, ngăn không khí đi vào đồng thời cho phép khí

¹⁾ V.PDB: Vienna Pee Dee Belemnite.

²⁾ NBS 22 là chất chuẩn NIST 8539 của Viện Tiêu chuẩn và Công nghệ quốc gia Hoa Kỳ hoặc chất chuẩn tương đương của Cơ quan Năng lượng Nguyên tử Quốc tế (IAEA). Thông tin đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn và không ấn định phải sử dụng chúng. Có thể sử dụng các sản phẩm khác nếu cho các kết quả tương đương.

cacbon dioxid đi ra.

5.3 Hệ thống máy tính, kiểm soát và ghi lại các thông số của quá trình lên men.

5.4 Máy ly tâm, có gia tốc ly tâm tối thiểu 3 000 g.

5.5 Hệ thống chưng cất hơi nước, để tách etanol ra khỏi sản phẩm chứa cồn hoặc đồ uống có cồn, dùng để xác định hàm lượng etanol.

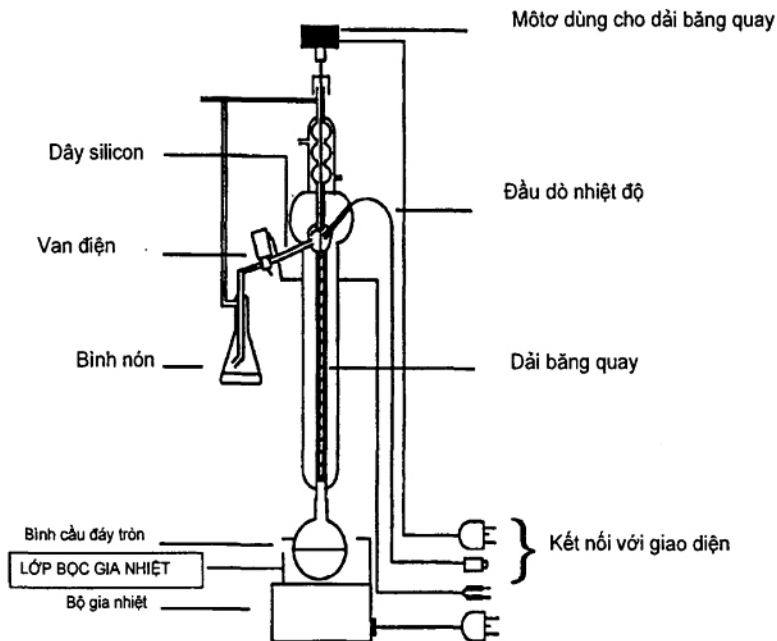
5.6 Máy đo tỷ trọng bằng điện tử, để xác định hàm lượng etanol.

5.7 Thiết bị chưng cất, để tách etanol

Thiết bị chưng cất gồm: cột cadiot với dải băng quay (bộ phận chuyển động Teflon) hoặc để đạt hiệu quả và kiểm soát chất lượng tốt hơn thì sử dụng hệ thống chưng cất được tự động hóa (xem Hình 1); bộ gia nhiệt có bộ phận điều chỉnh điện áp; bình cầu đáy tròn 1 L có khớp nối cổ thủy tinh mài, bình nón 125 ml có khớp nối cổ thủy tinh mài; chai thủy tinh dung tích 125 ml và 60 ml có nắp đậy bằng chất dẻo.

CỘT CADIOT

Hệ thống kiểm soát chưng cất tự động dùng cho phép phân tích
SNIF-NMF



Hình 1 – Thiết bị chưng cất để tách etanol

CẢNH BÁO – Etanol là chất dễ cháy, cần cẩn thận khi chưng cất. Cần thu nhận etanol như là chất thải độc hại.

TCVN 13815:2023

Đặc tính hiệu năng: Hệ thống chưng cất được chuẩn bị phải có khả năng chiết được $\geq 96\%$ etanol ra khỏi dịch lên men có hàm lượng etanol từ 3 % đến 20 % (thể tích). Hàm lượng etanol của dịch chưng cất phải $\geq 90\%$ (khối lượng) để đảm bảo phân tách đồng vị của dịch chưng cất $< 0,2\%$ đối với $\delta^{13}\text{C}$.

5.8 Bộ chuẩn độ Karl Fischer.

5.9 Máy đo khối phổ tỷ số đồng vị (IRMS), có khả năng xác định thành phần ^{13}C của khí cacbon dioxit phân bố tự nhiên, có độ chụm nội bộ đạt 0,05 ‰ hoặc cao hơn (biểu thị bằng giá trị δ tương đối). Độ chụm nội bộ được xác định là chênh lệch giữa hai phép đo của cùng một mẫu cacbon dioxit.

Máy đo khối phổ tỷ số đồng vị được gắn ba bộ thu nhận với bộ ghi đồng thời ở số khối là m/z 44, 45 và 46. Máy cũng được gắn với hệ thống dẫn kép để đo mẫu thử và mẫu chuẩn hoặc sử dụng kỹ thuật dòng chảy liên tục (CF) (máy CF-IRMS).

5.10 Thiết bị đốt mẫu, chuyển hóa etanol thành cacbon dioxit (CO_2) và có thể loại bỏ tất cả các sản phẩm cháy khác (bao gồm cả hơi nước) mà không có thành phần đồng vị.

Trong trường hợp dùng máy CF-IRMS, đốt cháy một lượng mẫu thử và dẫn cacbon dioxit tạo thành vào buồng ion hóa của bộ phận IRMS. Máy CF-IRMS bán sẵn có thể là máy phân tích nguyên tố-đo khối phổ tỷ số đồng vị (EA-IRMS) để bơm chất lỏng hoặc chất rắn hoặc máy sắc ký khí-đốt-đo khối phổ tỷ số đồng vị (GC-C-IRMS). Trong trường hợp sử dụng hệ thống chuẩn bị gián tiếp thủ công thì cacbon dioxit tạo thành từ quá trình đốt cháy mẫu thử và mẫu chuẩn sẽ được thu vào buồng chứa sau đó đưa vào hệ thống dẫn của máy đo khối phổ tỷ số đồng vị.

5.11 Cân phân tích, có thể cân chính xác đến 0,1 mg.

5.12 Pipet định mức, dung tích 20 μL .

5.13 Kim, phù hợp để đóng gói capsul.

5.14 Xyranh, dung tích 10 μL , để bơm chất lỏng

5.15 Lọ nhỏ (vial), dung tích 2 ml, có nắp đậy kín và màng lót để chứa chất lỏng cần bơm.

5.16 Bình định mức, dung tích 200 ml.

CHÚ THÍCH 1: Các thiết bị 5.1, 5.3, 5.6 và 5.8 có thể thay thế bằng thiết bị thích hợp khác [ví dụ: dùng cốc đo tỷ trọng (pycnometer) để đo hàm lượng etanol và thiết bị sắc ký lỏng để đo hàm lượng đường]. Hàm lượng etanol trong dịch lên men [từ 3 % đến 12 % (thể tích)] được đo chính xác đến 0,05 % (thể tích) và hàm lượng etanol chưng cất [từ 90 % đến 96 % (khối lượng)] được đo chính xác đến 0,1 % (khối lượng).

CHÚ THÍCH 2: Đối với hệ thống đốt cháy gián tiếp thủ công thì vật liệu và vật tư tiêu hao phụ thuộc vào hệ thống đốt cháy sử dụng trong phòng thử nghiệm. Danh mục vật liệu và vật tư tiêu hao nêu trên được thiết lập cho hầu hết các hệ thống thông thường (EA-IRMS và GC-C-IRMS). Có thể thay thế bằng các vật liệu khác nếu cho các kết quả tương đương.

5.17 Bình cầu đáy tròn, có dung tích thích hợp.

6 Cách tiến hành

6.1 Lên men mẫu

6.1.1 Yêu cầu chung

Lấy một lượng mẫu thử đủ để lên men sao cho thu được ít nhất 10 g etanol. Không bổ sung thêm chất dinh dưỡng vào môi trường lên men vì sẽ tạo ra sự phân tách đồng vị.

Hàm lượng etanol tiềm năng của mẫu thử, C_1 , biểu thị bằng phần trăm thể tích, được tính theo Công thức (1) như sau:

$$C_1 = \frac{C_s}{17} \quad (1)$$

Trong đó:

C_s là nồng độ đường trong mẫu, tính bằng gam trên lít (g/L);

17 là nồng độ thực tế của đường, tính bằng gam trên lít (g/L), để tạo ra 1 % (thể tích) etanol.

6.1.2 Lên men nước quả

Cho 0,6 L nước quả (loại chưa cô đặc) hoặc nước quả cô đặc đã hoàn nguyên, đã xác định trước độ Brix, vào bình lên men (5.2), thêm 3 g nấm men khô (4.1). Đậy nắp bình lên men để tránh không khí xâm nhập. Để nước quả lên men ở nhiệt độ khoảng 20 °C cho đến khi tất cả lượng đường được chuyển hóa thành etanol. Sử dụng hệ thống máy tính (5.3) để kiểm soát quá trình lên men, nếu cần. Kiểm tra sự kết thúc quá trình lên men đường bằng cách đo lượng đường còn lại, sử dụng máy sắc ký lỏng hoặc quan sát phản ứng tạo màu (ví dụ: Clinitest). Quá trình lên men của nước táo hoặc nước dưa kéo dài khoảng 2 ngày (có thể kéo dài 4 ngày đến 5 ngày đối với nước táo). Ly tâm (5.4) dịch lên men khoảng 2 min ở tốc độ 4 000 r/min.

Xác định hàm lượng etanol của dịch lên men (C_s , %, thể tích) như sau: Dùng pipet (5.12) lấy 20 ml phần nổi phía trên sau khi ly tâm, cho vào bình định mức 200 ml (5.16) và pha loãng bằng nước cất (độ pha loãng 10 lần). Chuyển 200 ml dịch huyền phù đã pha loãng vào bình cầu đáy tròn (5.17) và chưng cất bằng hệ thống chưng cất hơi nước (5.5). Thu lấy dịch chưng cất vào bình định mức 200 ml (5.16), pha loãng bằng nước cất và đo hàm lượng etanol bằng máy đo tỷ trọng (5.6) ở 20 °C ± 0,01 °C (độ không đảm bảo đo tuyệt đối đối với dung dịch etanol 5 % là 0,05 %). Ngoài ra, có thể xác định hàm lượng etanol của dịch lên men bằng cốc đo tỷ trọng.

6.1.3 Lên men xirô cây phong

Xác định hàm lượng chất rắn hòa tan (độ Brix) của mẫu thử. Pha loãng mẫu thử trong bình lên men (5.2) bằng nước đến thể tích 0,6 L hoặc nhiều hơn một chút để thu được mẫu pha loãng đạt khoảng 12 °Bx (tốc độ lên men tối ưu khi độ Brix đạt 12 °Bx ± 1 °Bx). Thêm 3 g nấm men khô (4.1) và đồng hóa bằng cách lắc. Đóng bộ phận bẫy của bình lên men để tránh không khí xâm nhập. Để dịch lên men ở 20 °C cho đến khi tất cả lượng đường được chuyển hóa thành etanol. Kiểm tra sự kết thúc quá trình lên men đường bằng cách đo lượng đường còn lại bằng máy sắc ký lỏng hoặc quan sát phản ứng tạo màu. Ly tâm (5.4) dịch lên men. Xác định hàm lượng etanol của dịch lên men như trong 6.1.2.

6.1.4 Lên men đường mía

Cân 72 g đường mía dạng tinh thể, chính xác đến 0,01 g, pha loãng trong bình lên men (5.2) bằng nước đến 0,6 L hoặc nhiều hơn một chút, để thu được mẫu pha loãng đạt khoảng 12 °Bx (tốc độ lên men tối ưu khi độ Brix đạt 12 °Bx ± 1 °Bx). Thêm 3 g nấm men khô (4.1) và đồng hóa bằng cách lắc. Đóng bộ phận bẫy của bình lên men để tránh không khí xâm nhập. Để dịch lên men ở 20 °C cho đến khi tất cả lượng đường được chuyển hóa thành etanol. Kiểm tra sự kết thúc quá trình lên men đường bằng cách đo lượng đường còn lại bằng máy sắc ký lỏng hoặc quan sát phản ứng tạo màu. Ly tâm dịch lên men. Xác định hàm lượng etanol của dịch lên men như trong 6.1.2.

Bảo quản dịch lên men trong tủ lạnh, trước khi chưng cất, nếu cần. Bắt đầu chưng cất trong vòng 24 h sau khi kết thúc quá trình lên men.

6.2 Chưng cất etanol trong dịch lên men

Đặt 3 viên đá bọt (4.5) (để tránh tạo bọt) vào bình chưng cất của thiết bị chưng cất (5.7). Cân bình rỗng (W_{B0}). Cho ít nhất 400 ml dịch lên men (V) đã đồng hóa vào bình và cân lại (W_{B1}). Tính khối lượng của dịch lên men được thêm vào bình, W_J , biểu thị bằng gam (g), theo Công thức (2) như sau:

$$W_J = W_{B1} - W_{B0} \quad (2)$$

Trong đó:

W_{B0} là khối lượng bình rỗng, tính bằng gam (g);

W_{B1} là khối lượng bình chứa dịch lên men đã đồng hóa, tính bằng gam (g).

Bật máy tuần hoàn nước trong bình ngưng của thiết bị chưng cất (5.7). Lắp bình nón có khớp nối cổ thủy tinh mài 125 ml đã được cân trước (W_{E0}) để thu dịch chưng cất. Gắn bình cầu đáy tròn chứa dịch lên men với cột cadiot và gia nhiệt đến sôi. Khi dịch lỏng sôi hồi lưu, bật motor quay và đợi 5 min để đạt được trạng thái cân bằng.

Sau khi đạt tỷ số hồi lưu ổn định trên đỉnh cột, thu dịch lỏng đang sôi ở nhiệt độ từ 78 °C đến 78,5 °C (xem Hình 1 về vị trí thích hợp của đầu dò nhiệt độ). Khi nhiệt độ vượt quá 78,5 °C, dừng việc thu nhận trong 5 min để tránh thu nước. Sau khi nhiệt độ trở về 78 °C (etanol tinh khiết được chưng cất), tiếp tục thu lấy dịch chưng cất cho đến khi nhiệt độ tăng lên 78,5 °C. Lặp lại quá trình này cho đến khi nhiệt độ ổn định cho thấy đã chưng cất hết etanol.

CHÚ THÍCH: Quá trình chưng cất kéo dài khoảng 4 h. Thông thường, có thể thu hồi 98 % đến 98,5 % etanol trong dịch lên men, dịch chưng cất có hàm lượng etanol trong dải từ 91 % đến 93 % (khối lượng) [93 % đến 95 % (thể tích)].

Cân bình chứa dịch chưng cất (W_{E1}) và tính khối lượng chính xác của dịch chưng cất, W_D , biểu thị bằng gam (g), theo Công thức (3) như sau:

$$W_D = W_{E1} - W_{E0} \quad (3)$$

Trong đó:

W_{E0} là khối lượng bình định mức rỗng, tính bằng gam (g);

W_{E1} là khối lượng bình chứa dịch chưng cất, tính bằng gam (g).

Làm nguội bình cầu đáy tròn chứa phần còn lại của dịch lên men và cân (W_{B2}). Tính khối lượng phần còn lại của dịch lên men (phần nước trong dịch lên men), W_R , biểu thị bằng gam (g), theo Công thức (4) như sau:

$$W_R = W_{B2} - W_{B0} \quad (4)$$

Trong đó:

W_{B0} là khối lượng bình cầu rỗng, tính bằng gam (g).

W_{B2} là khối lượng bình cầu chứa phần còn lại của dịch lên men, tính bằng gam (g).

Bảo quản dịch chưng cất trong chai thủy tinh (khoảng trống trong chai càng ít càng tốt) có nắp đậy Teflon. Bình phải được đậy kín khí để tránh phân tách đồng vị (do bay hơi). Sau mỗi lần chưng cất, làm sạch cột cadiot của thiết bị chưng cất bằng cách thổi khí nitơ hoặc không khí khô trong 10 min để loại bỏ etanol dư.

6.3 Xác định hàm lượng etanol của dịch chưng cất

6.3.1 Tính hàm lượng etanol của dịch chưng cất

Cân khoảng 0,25 ml dịch chưng cất (m_2), chính xác đến 0,1 mg. Xác định lượng nước trong dịch chưng cất (m_1) bằng bộ chuẩn độ Karl Fischer (5.8).

TCVN 13815:2023

Hàm lượng etanol của dịch chưng cất, t , biểu thị bằng phần trăm khối lượng, tính theo Công thức (5) như sau:

$$t = \frac{m_2 - m_1}{m_2} \times 100 \quad (5)$$

Trong đó:

m_1 là khối lượng nước trong dịch chưng cất đo được, tính bằng gam (g);

m_2 là khối lượng dịch chưng cất sử dụng trong phương pháp Karl Fisher, tính bằng gam (g).

6.3.2 Tính khối lượng hao hụt trong quá trình chưng cất

Hao hụt khối lượng trong quá trình chưng cất, W_L , biểu thị bằng gam (g), tính theo Công thức (6) như sau:

$$W_L = W_J - (W_D + W_R) \quad (6)$$

Trong đó:

W_J là khối lượng của dịch lên men đem chưng cất tính theo Công thức (2), tính bằng gam (g);

W_D là khối lượng chính xác của dịch chưng cất tính theo Công thức (3), tính bằng gam (g);

W_R là khối lượng phần còn lại của dịch lên men tính theo Công thức (4), tính bằng gam (g).

6.3.3 Tính hiệu suất chưng cất

Hiệu suất chưng cất, C , biểu thị bằng phần trăm khối lượng, tính theo Công thức (7) như sau:

$$C = \frac{t \times W_D}{0,78924 \times V \times t_Q} \times 100 \quad (7)$$

Trong đó:

t là hàm lượng etanol của dịch chưng cất tính theo Công thức (5), tính bằng phần trăm khối lượng (%);

t_Q là hàm lượng etanol của dịch lên men (xem 6.1.2), tính bằng phần trăm thể tích (%).

W_D là khối lượng chính xác của dịch chưng cất tính theo Công thức (3), tính bằng gam (g);

V là thể tích chính xác của dịch lên men đem chưng cất (xem 6.2), tính bằng mililit (ml).

Hiệu suất chưng cất phải ≥ 96 %, trong khi đó tỷ số đồng vị của etanol trong dịch chưng cất bị thay đổi

do có sự phân tách đồng vị đáng kể trong quá trình chưng cất. Cần tuân thủ nghiêm ngặt các điều kiện để đạt hiệu suất chưng cất cao và hàm lượng etanol cao nhằm giữ cho sự phân tách đồng vị ở mức tối thiểu. Có thể đạt được các yêu cầu này bằng cách sử dụng hệ thống chưng cất (6.7) tự động hóa.

6.3.5 Tính hao hụt khối lượng tương đối

Hao hụt khối lượng tương đối, R_{wL} , biểu thị bằng phần trăm khối lượng, theo Công thức (8) như sau:

$$R_{wL} = \frac{W_L}{W_J} \times 100 \quad (8)$$

Trong đó:

W_L là khối lượng hao hụt của dịch chưng cất tính theo Công thức (6), tính bằng gam (g);

W_J là khối lượng của dịch lên men tính theo Công thức (2), tính bằng gam (g).

Hao hụt khối lượng tương đối $> 0,5 \%$ cho thấy hao hụt bất thường trong bước chưng cất (ví dụ: rò rỉ trong hệ thống chưng cất hoặc sai số khi cân).

6.4 Xác định đồng vị ^{13}C của etanol trong dịch chưng cất

6.4.1 Khái quát

Đồng vị ^{13}C của etanol được xác định bằng hai phương pháp (6.4.2 và 6.4.3), các phương pháp này đốt cháy mẫu etanol trước khi phân tích đồng vị cacbon bền. Các phương pháp được sử dụng cần đảm bảo mẫu etanol được chuyển đổi hoàn toàn thành cacbon dioxide mà không bị hao hụt etanol do bay hơi, phù hợp cho việc chuẩn bị cacbon dioxide để phân tích đồng vị.

6.4.2 Phương pháp dòng chảy liên tục dựa trên việc sử dụng máy phân tích nguyên tố kết hợp máy đo khối phổ

Cho chạy chất chuẩn làm việc thể rắn (dạng viên) ở các khoảng đều nhau trong dãy xác định, nên dùng axit glutamic làm chất chuẩn. Thực hiện với chất chuẩn làm việc dạng viên vào thời điểm bắt đầu và kết thúc dãy phép xác định. Kiểm tra độ sạch của viên chất chuẩn, kim và khay. Dùng đầu cong của kim lấy một viên có kích thước vừa đủ. Sử dụng pipet 20 μl (5.12) đưa một lượng dịch lỏng cần thiết vào trong viên chất chuẩn, giữ bằng kim chuyên dụng. Chuẩn bị hai viên chất chuẩn cho mỗi mẫu thử và mẫu chuẩn. Nếu nghi ngờ về độ kín của viên chất chuẩn thì phải chuẩn bị lại. Etanol là hợp chất dễ bay hơi, do vậy cần cẩn thận trong quá trình làm kín viên chất chuẩn có chứa etanol. Đặt viên chất chuẩn vào khoang mẫu tự động của máy phân tích vi mô ở vị trí thích hợp được đối chiếu theo số thứ tự.

CHÚ THÍCH 1: Lấy khoảng 3,8 mg etanol tuyệt đối hoặc 4,2 mg dịch chưng cất có hàm lượng etanol 92 % (khối lượng) cần để

TCVN 13815:2023

thu được 2 mg cacbon. Tính lượng dịch chưng cất thích hợp bằng cách tương tự theo lượng cacbon cần thiết (phụ thuộc vào đặc tính của máy đo khối phổ).

CHÚ THÍCH 2: Khi sử dụng bộ bơm chất lỏng, thì không cần xem xét đến quy trình nén chất rắn.

Kiểm tra áp suất của máy đo điện áp, bằng cách chỉnh đầu ra của bình khí nén, kiểm tra nhiệt độ lò theo quy định kỹ thuật của nhà sản xuất.

Kiểm tra độ rò rỉ trong hệ thống EA-IRMS (ví dụ: bằng cách theo dõi dòng ion m/z 28 tương ứng với N_2).

Chỉnh máy IRMS (5.9) để đo cường độ của dòng ion m/z 44, m/z 45 và m/z 46.

Đề hệ thống cân bằng.

Đặt các mẫu chất chuẩn dạng viên vào máy phân tích và bắt đầu đo (đốt cháy thành cacbon dioxit và phân tích).

Thao tác máy đo khối phổ theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

6.4.3 Phương pháp gián tiếp dựa trên việc đốt cháy gián tiếp etanol và đo hai ống dẫn

Sử dụng máy phân tích nguyên tố tự động và dùng hệ thống hộp bẫy mẫu tự động trong cùng một quy trình làm việc nêu trong 6.4.2.

Chuyển hàm lượng cacbon của mẫu thành cacbon dioxit như sau:

- Hệ thống đốt cháy khép kín được làm đầy khí ôxy đối lưu;
- Bật máy phân tích nguyên tố có dòng khí heli/ôxy;
- Đậy kín ống thủy tinh đã được làm đầy đồng ôxit làm chất ôxy hóa, nhưng cẩn thận để tránh hình thành đồng cacbonat.

Sau khi etanol chuyển thành cacbon dioxit, cố định vật chứa mẫu vào hệ thống dẫn và tiến hành phân tích đồng vị cacbon. Đưa cacbon dioxit vào máy đo khối phổ bằng hệ thống dẫn kép sao cho dòng ion của mẫu có thể được so sánh với dòng ion của cacbon dioxit chuẩn đã hiệu chuẩn trước bằng chuẩn cacbonat. Vận hành máy đo khối phổ theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

6.5 Kiểm soát chất lượng các phép đo

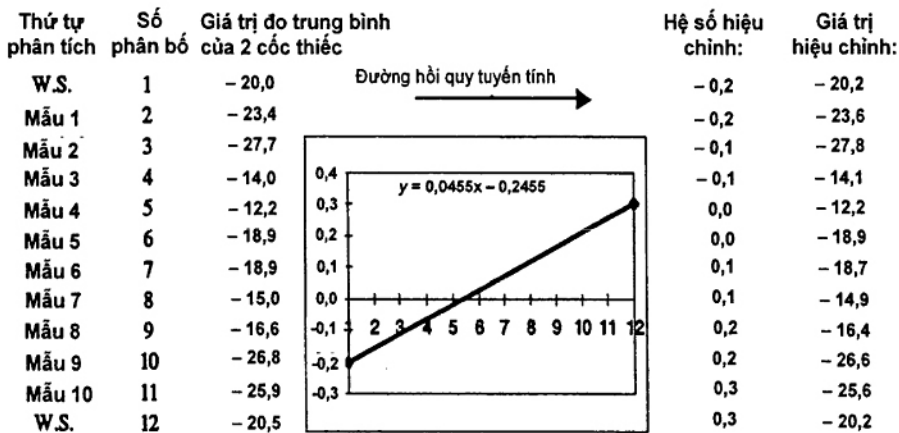
Trước tiên, kiểm tra hệ thống bằng cách đốt cháy chất chuẩn quốc tế (4.4) và chỉnh các kết quả tiếp theo về giá trị $\delta^{13}C$ được chấp nhận hoặc cho các kết quả thu được đối với ba phép xác định độc lập của chuẩn quốc tế, để chuẩn hóa các kết quả. Tỷ lệ khối lượng/diện tích của cacbon dioxit có thể được xác định bằng cách sử dụng thiết bị (như máy tích phân) để đo diện tích của pic cacbon dioxit tương ứng [thường đo được bằng máy phân tích khí (catharometer)].

CHÚ THÍCH 1: Kiểm tra để đảm bảo giá trị $\delta^{13}\text{C}$ đối với chất chuẩn làm việc không lệch quá 0,5 ‰ giá trị chuẩn, nếu lệch, bật lại máy đo khối phổ.

CHÚ THÍCH 2: Đối với từng mẫu thử, kiểm tra lặp lại hai giá trị trong mỗi lần chạy liên tiếp. Nếu chênh lệch giữa hai mẫu $\leq 0,3$ ‰ thì chấp nhận phép đo, kết quả cuối cùng cho một mẫu nhất định là trung bình của hai mẫu dạng viên. Nếu độ chênh $> 0,3$ ‰ thì lặp lại phép đo.

CHÚ THÍCH 3: Cần kiểm tra chất chuẩn làm việc và các mẫu etanol, biên độ tín hiệu được duy trì trong dải thích hợp theo hướng dẫn của nhà sản xuất máy đo khối phổ (biên độ thấp hơn có thể cho thấy sự bay hơi của etanol do chưa hàn kín mẫu).

CHÚ THÍCH 4: Trong trường hợp đo trực tiếp, hiệu chỉnh giá trị $\delta^{13}\text{C}$ của mẫu theo chênh lệch giữa giá trị $\delta^{13}\text{C}$ của chuẩn làm việc và giá trị thực, được xác định trước theo chuẩn gốc. Hiệu chỉnh độ chênh thường được tiến hành tự động bằng phần mềm của thiết bị. Độ trôi có thể được coi là độ tuyến tính giữa hai phép đo chuẩn làm việc $\delta^{13}\text{C}$. Đo chuẩn làm việc ở thời điểm bắt đầu và thời điểm kết thúc dãy mẫu. Tiến hành hiệu chỉnh từng mẫu theo phép nội suy tuyến tính giữa hai giá trị của chênh lệch (giữa giá trị khác biệt của chuẩn làm việc và của các phép đo). Ví dụ về hiệu chỉnh nêu trong Hình 2. Giá trị tham chiếu với giá trị $\delta^{13}\text{C}$ (‰). Trong ví dụ này, giá trị thực chấp nhận được của chuẩn làm việc (WS) là $-20,2$ ‰.



Hình 2 – Ví dụ về hiệu chỉnh độ trôi

7 Tính kết quả

Giá trị của thành phần đồng vị cacbon 13 ($\delta^{13}\text{C}$) biểu thị bằng phần nghìn (‰) theo chuẩn gốc V.PDB, được tính theo Công thức (9) như sau:

$$\delta^{13}\text{C} = \frac{R_1 - R_0}{R_0} \times 1000 \quad (9)$$

Trong đó:

R_1 là tỷ số đồng vị $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ của mẫu thử (xem 6.4);

R_0 là tỷ số đồng vị $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ của chuẩn V.PDB (trong trường hợp này, $R_0 = 0,0112372$).

8 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo kết quả phải bao gồm các thông tin sau:

- mọi thông tin cần thiết để nhận biết mẫu thử (loại mẫu, nguồn gốc mẫu, ký hiệu);
- viện dẫn tiêu chuẩn này;
- ngày và loại quy trình lấy mẫu (nếu có);
- ngày nhận mẫu;
- ngày thử nghiệm;
- các kết quả thử và đơn vị biểu thị;
- mọi thao tác không quy định trong tiêu chuẩn này hoặc tùy chọn có thể ảnh hưởng đến kết quả.

Phụ lục A

(Tham khảo)

Kết quả của phép thử liên phòng thử nghiệm xác định $\delta^{13}\text{C}$ của etanol trong nước quả và xirô cây phong bằng phương pháp IRMS

Các kết quả của phép thử liên phòng thử nghiệm về độ chụm của phương pháp được nêu trong Bảng A.1.

Bảng A.1 – Kết quả của phép thử liên phòng thử nghiệm về giá trị $\delta^{13}\text{C}$

Mẫu	Nước cam ^a	Nước cam và đường mía	Nước táo và đường mía	Xirô cây phong và đường mía	Nước dứa và đường từ củ cải đường	Đường mía
Đường được bổ sung, %	— ^b	16 ^c	41 ^c	26 ^c	41 ^c	— ^b
Giá trị $\delta^{13}\text{C}$ trung bình ^a , ‰	– 26,67	– 24,36	– 20,44	– 20,73	– 20,0	– 12,45
Số phòng thử nghiệm còn lại sau khi trừ ngoại lệ	12	12	10	12	11	12
Độ lệch chuẩn lặp lại, s_r , ‰	0,10	0,08	0,06	0,12	0,08	0,16
Độ lệch chuẩn tái lập, s_R , ‰	0,22	0,22	0,23	0,17	0,23	0,26
Độ lặp lại, r ($= 2,8 \times s_r$)	0,28	0,21	0,17	0,32	0,22	0,46
Độ tái lập, R ($= 2,8 \times s_R$)	0,62	0,62	0,65	0,49	0,65	0,73
^a tỷ số $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ của etanol thu được từ nước quả và xirô cây phong xác định bằng IRMS, biểu thị bằng $\delta^{13}\text{C}$ so với chuẩn cacbonat V.PDB. ^b cặp mẫu mù. ^c cặp Youden.						

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] AOAC International (2004), AOAC 2004.01, *Carbon Stable Isotope Ratio of Ethanol Derived from Fruit Juices and Maple Syrups. Isotope Ratio Mass Spectrometry (IRMS)*
 - [2] International Fruit Juice Union (2001), Method No. 8, *Determination of Soluble Solids (Indirect Method by Refractometry)*, IFU, Paris, France
 - [3] Craig, H. (1957) *Geochim. Cosmochim. Acta* **12**, 133–149
-